

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/10, 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/64568 (43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01353</p> <p>(22) Date de dépôt international: 8 juin 1999 (08.06.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/07185 8 juin 1998 (08.06.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE DE NANTES [FR/FR]; Présidence de l'Université, 1, quai de Tourville, Boîte postale 13622, F-44035 Nantes Cedex 01 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUISIT, Ghislaine [FR/FR]; 2, allée de la Tremperie, F-44000 Nantes (FR). SALVETTI, Anna [FR/FR]; 15, avenue Chanzy, F-44000 Nantes (FR). MOULLIER, Philippe [FR/FR]; 1, impasse de la Grillonnais, F-44115 Basse Goulaine (FR). COSSET, François-Loïc [FR/FR]; 30, Grande rue de la Guillotière, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataires: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. etc.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: PACKAGING KIT</p> <p>(54) Titre: KIT D'ENCAPSIDATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for elaborating a cell line capable of producing in transient and/or stable manner recombinant retroviruses, of an order not less than 10⁶ UI/ml, and a kit for implementing said method. Said kit contains at least a non retroviral virus and a retrovirus.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des rétrovirus recombinants de façon transitoire et/ou stable, à un titre au moins égal à 10⁶ UI/ml, et un kit pour la mise en oeuvre du procédé. Ce dernier contient au moins un virus non rétroviral et un rétrovirus.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

KIT D'ENCAPSIDATION

La présente invention concerne un procédé pour l'établissement de lignées cellulaires eucaryotes hautement productrices de particules rétrovirales de manière stable ou transitoire. Elle porte également sur une trousse permettant l'encapsidation rétrovirale ainsi que sur une trousse pour l'établissement d'une lignée productrice de rétrovirus.

La production de rétrovirus recombinants et défectifs pour leur réplication est une approche très attractive dans l'établissement de vecteurs pour la thérapie génique. En effet, un des objectifs de cette approche thérapeutique est la modification stable des cellules cibles. A cet effet, de nombreux vecteurs rétroviraux ont été développés basés sur l'aptitude des virus à assurer une expression stable dans les cellules qu'ils infectent. Tous les systèmes développés jusqu'à présent ont leurs avantages et leurs limites. Il s'agit essentiellement des systèmes rétroviraux et des systèmes adénoviraux.

Les rétrovirus qui présentent l'avantage d'une intégration stable dans les cellules cibles, avantage tant pour la persistance de l'expression que pour la sécurité de l'utilisation, présentent des limites et des inconvénients :

- le titre des particules infectieuses produites par les cellules d'emballage reste limité ;
- par ailleurs, les rétrovirus n'infectent pas les cellules quiescentes, ce qui limite leur expression à des cellules en division. En outre, on observe une efficacité médiocre du transfert de gènes in vivo.

Une des raisons évoquées en est une activation rapide du complément du sérum entraînant l'inactivation des particules virales. Cet inconvénient peut être surmonté par la production rétrovirale in situ par greffage des cellules productrices (Rollins, S.A. et al 1996, Human gene Therapy 7:619-626). La génération in situ de vecteurs rétroviraux a

également été effectuée par une infection transitoire des cellules cibles avec des vecteurs rétroviraux avec un plasmide porteur des fonctions rétrovirales ; par exemple, P. Noguez-Hellin et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 : 41) ont décrit le transfert in situ de vecteurs rétroviraux et des éléments d'emballage par injection directe d'ADN plasmidique porteurs de séquences rétrovirales défectives (plasmovirus).

Les cellules cibles transfectées par le plasmovirus se transforment en cellules productrices de rétrovirus infectieux défectifs après transfection par une cassette d'expression porteuse des séquences absentes du vecteur rétroviral. Cette approche associe la simplicité d'utilisation des plasmides avec l'infectivité et l'expression à long terme des rétrovirus tout en apportant un taux de propagation compatible avec l'utilisation thérapeutique.

Cette approche, qui a l'avantage de permettre d'améliorer l'efficacité du transfert de gènes, nécessite une mise au point longue et fastidieuse pour isoler les producteurs efficaces lorsque l'on cherche à optimiser un système de production au regard d'un transgène donné. Elle est donc peu adaptée aux utilisations ponctuelles ou sur cellules primaires, en recherche comme en clinique.

Des productions de rétrovirus à haut titre peuvent être obtenues à partir de lignées productrices stables (Davis J.L., 1997, Human Gene Therapy 8, 1459-67, 1997). Les cellules d'emballage, qui expriment de façon stable les protéines de structure gag-pol et env, sont transférées par un plasmide porteur des vecteurs génomiques et sélectionnées pour leur capacité de production de rétrovirus. Néanmoins, les sous-clones présentent une grande variété dans les titres obtenus et leur sélection requiert des mois de travail. Une méthode alternative consiste à obtenir une production de particules rétrovirales transitoires par transfection dans des cellules d'emballage, soit du vecteur directement,

soit des trois plasmides porteurs respectivement de gag-pol, env. et le génome viral.

Les titres de production obtenus sont malgré tout trop faibles et différentes stratégies ont été développées pour augmenter au moins l'expression transitoire des gènes. On peut citer : LANDAU, N.R., et al., 5 l'expression transitoire des gènes. On peut citer : LANDAU, N.R., et al., 1992, J. VIROL. 66, 5110-5113, et SONEOKA, Y. et al, 1995, N.A.R., 23, 628-633.

Une nouvelle approche a été développée récemment visant à introduire un grand nombre de copies des plasmides dans les cellules productrices. Les auteurs utilisent une chimère du virus Semliki Forest (SFV) (Li et al., 1998, PNAS, 95, 3650) du virus Herpes simplex (HSV) : 10 (SAVARD et al., 1997, J. VIROL. 71, 4111) ou de l'adénovirus portant le gène gag-pol, env et/ou le vecteur. Néanmoins, la capacité à produire des rétrovirus recombinants diffère selon les systèmes, selon leur toxicité 15 respective vis-à-vis de la cellule productrice.

Par ailleurs, il est bien connu que l'utilisation de vecteurs adénoviraux permet d'obtenir un taux élevé de transfert de gènes dans différentes cellules cibles. Ces vecteurs sont limités par la durée de l'expression du transgène du fait qu'ils ne s'intègrent pas dans le génome 20 de la cellule cible et donc sont rapidement perdus dans les descendances des cellules transfectées. Ils présentent en outre le risque de produire par recombinaison des adénovirus réplcatifs.

Feng et al (1997, Nature Biotechnology, 15: 866) ont récemment développé un système de vecteur chimérique dans lequel les 25 avantages des vecteurs adénoviraux et rétroviraux sont combinés pour l'obtention d'une transduction stable et d'une bonne productivité in vivo. Cela est réalisé par l'induction de la formation de cellules productrices de rétrovirus in situ par transfert d'un vecteur adéno-rétroviral et des fonctions d'empaquetage rétrovirales.

Cette approche visait à réaliser des cellules cibles capables de produire des rétrovirus in vivo, eux-mêmes capables d'infecter les cellules voisines. Néanmoins, aucun élément quantitatif n'est donné en faveur d'une bonne productivité de particules rétrovirales.

5 La présente invention vise à fournir les outils à l'homme du métier qui souhaite obtenir une production rapide et à haut rendement de particules rétrovirales porteuses d'un transgène d'intérêt et dans des conditions de sécurité satisfaisantes.

10 La présente invention résulte du besoin des scientifiques d'optimiser rapidement la production des particules rétrovirales porteuses d'un transgène, partant du fait que l'expression stable d'un transgène dans les cellules cibles était de préférence recherchée, expression qui passe par une intégration dudit transgène dans la cellule hôte, et donc par l'utilisation de rétrovirus recombinants. Il fallait donc associer différents moyens et
15 proposer un protocole d'utilisation de ces moyens qui permette au scientifique, en recherche comme en clinique, de générer et de caractériser rapidement le système producteur le mieux adapté au transgène d'une part, et aux cellules cibles d'autre part.

20 Dans l'ensemble du texte qui suit, les termes utilisés auront les définitions suivantes :

TRANSGENE signifie toute séquence hétérologue codant pour une protéine de structure ou une protéine enzymatique ou combinaison de gènes dont l'expression est recherchée dans une cellule cible pour quelque raison que ce soit.

25 VIRUS ou PARTICULE VIRALE DEFECTIVE est un virus ou une particule virale incapable de réplication autonome.

TRANSFERT d'une séquence d'acide nucléique porteur de gènes recombinants dans une cellule désigne collectivement la transfection de ladite cellule par un vecteur ou plasmide contenant des gènes

recombinants ou l'infection de ladite cellule par un virus dont le génome contient ces mêmes gènes recombinants.

La présente invention porte sur un procédé de production de rétrovirus recombinants défectifs à haut titre par infection ou transfection in vivo de cellules cibles, par des virus ou des vecteurs viraux porteurs de séquences rétrovirales, caractérisé en ce que le ou les vecteurs viraux ou les virus sont d'origine adénovirale ou baculovirale. Elle porte également sur un procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des particules rétrovirales à haut titre et dans des conditions de sécurité satisfaisante, après infection ou transfection de ces cellules par un virus ou un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral desdites cellules.

Le procédé de l'invention permet, soit d'obtenir une lignée exprimant le vecteur rétroviral transitoirement, ou de manière stable sous la forme d'un clone ou d'une population cellulaire et permettant une expression transitoire des particules rétrovirales.

L'invention porte également sur une lignée cellulaire hépatique et sur son utilisation dans le procédé de l'invention.

La présente invention porte également sur une trousse pour l'obtention et la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène et comprenant au moins :

- un adénovirus porteur des fonctions rétrovirales gag-pol sous la forme d'une ou plusieurs ampoules permettant plusieurs manipulations distinctes à des concentrations variables ;
- un adénovirus porteur d'un gène env, présenté sous la même forme ; le gène env peut être d'origine diverse. Il peut être écotrope, xénotrope ou amphotrope. Il peut provenir par exemple du RD44 (virus de chat), du GaLV (virus de Gibbon) ou du VSV-G (virus de la stomatite vésiculaire). Il peut également être issu de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) et sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des

rétrovirus amphotrope "10 A1" ou tout type d'enveloppes ciblantes, chimériques etc.

- un plasmide portant le vecteur rétroviral, c'est-à-dire les séquences régulatrices contenant les LTR, la région d'encapsidation, avec
5 des sites multiples de clonage pour insérer le transgène. Il peut contenir de plus, si nécessaire :

. une origine de réplication de type SV40 et un marqueur de sélection de type néomycine, blasticidine ou autre ;

. un plasmide contrôle portant le vecteur rétroviral contenant
10 un gène rapporteur comme le gène LacZ pour vérifier la qualité de la manipulation.

Le rationnel des procédés et des kits de l'invention est le suivant :

Les systèmes de production classiques passent par la
15 sélection de lignées cellulaires exprimant de façon stable le vecteur et les fonctions d'encapsidation. Cette méthode peut durer plusieurs mois, et nécessite l'analyse de nombreux clones pour isoler les producteurs efficaces. Si elle permet l'obtention de surnageants de culture infectieux à un titre raisonnable (10^6 à 10^7 particules infectieuses par ml), elle restreint
20 néanmoins l'établissement de producteurs aux lignées cellulaires transformées. Elle est donc peu adaptée aux utilisations ponctuelles ou sur des cellules primaires que ce soit en recherche ou en clinique.

Un autre système de production utilisé est la production en transitoire, qui est plus souple et plus rapide, en permettant dès le
25 lendemain de la transfection des cellules cibles avec les plasmides portant les fonctions d'encapsidation et le vecteur, de recueillir un surnageant. Mais cette approche permet d'atteindre des titres seulement de l'ordre de 10^3 à 10^4 particules infectieuses par ml, exceptionnellement 10^5 .

Les inventeurs ont donc cherché à fournir un système
30 permettant, d'une part de sélectionner rapidement une lignée cellulaire

bonne productrice et, d'autre part, de produire des particules rétrovirales défectives à haut titre porteuses du transgène et sans émergence de virus compétent pour la réplication, et ce :

- soit en travaillant à partir d'une population cellulaire ou un clone exprimant le vecteur rétroviral en transitoire ;
- soit une population cellulaire ou un clone l'exprimant de façon stable.

Le vecteur rétroviral, porteur du transgène, des régions régulatrices du rétrovirus et des fonctions d'encapsidation, peut être introduit, soit par transfection des cellules par un plasmide porteur du vecteur, soit par infection par des particules rétrovirales dont le génome est porteur des séquences équivalentes.

L'expression transitoire est obtenue quasiment immédiatement après transfection du plasmide porteur du vecteur alors que l'expression stable est obtenue après deux semaines au moins de culture en milieu sélectif après transfection du plasmide porteur du vecteur ou après infection simple.

La production de particules rétrovirales par ces cellules ainsi transfectées ou infectées est réalisée en apportant les fonctions d'encapsidation rétrovirale au moyen d'un virus recombinant non rétroviral. A titre d'exemple de virus particulièrement appropriés à la mise en oeuvre du procédé de l'invention, on peut citer les baculovirus ou les adénovirus. L'infection, bien plus performante que la transfection, permet de toucher l'ensemble des cellules avec un nombre élevé de copies introduites. Ce dernier point a été jusqu'à présent suspecté être un facteur limitant dans les systèmes de production transitoire.

Pour des questions de sécurité, un mode de réalisation préféré est de placer les fonctions d'encapsidation rétrovirale gal-pol et env sur deux virus distincts. De la même façon, pour augmenter encore la sécurité du système, il est préférable de limiter les risques de

recombinaison entre la fin de pol et le début de env (régions chevauchantes chez Moloney-Murine Leukemia virus (MoMLV) avec émergence de virus "helper", les unités gag-pol, d'une part, et env, d'autre part proviennent de virus différents. A titre d'exemple, gag-pol peut être
5 issu de MoMLV alors que env peut provenir du virus de Gibbon (GaLV) ou du virus de chat (RD 114). Malgré une faible homologie de séquence, les virus chimériques associant gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, d'origines différentes restent parfaitement infectieux.

Description détaillée de l'invention :

10 L'invention porte sur un procédé de production de rétrovirus recombinants porteurs de gènes d'intérêt à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant :

- (a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,
- 15 (b) transfection par un vecteur porteur d'un gène d'intérêt sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des mêmes séquences que ledit vecteur,
- 20 (c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence psi et apportant les séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences,
- 25 (d) la culture de ces cellules dans un milieu approprié à la récolte des particules rétrovirales porteuses du transgène.

Dans ce procédé, le ou les vecteurs viraux ou les virus sont de préférence d'origine adénovirale ou baculovirale.

30 Dans la présente invention, gag-pol peut notamment être issu d'un lentivirus tel que le SIV (virus simien de l'immunodéficience).

Les séquences régulatrices et les séquences d'encapsidation rétrovirales du plasmide ou dans le virus décrit en b) sont de préférence issues de rétrovirus murins, et de lentivirus caprins, félins ou primates.

5 Le principe de base de l'invention est la constitution de vecteurs adénoviraux porteurs des séquences codant pour les fonctions rétrovirales. Dans l'ensemble du texte, il est bien entendu que, à chaque fois qu'il sera question d'adénovirus, de vecteur adénoviral, il pourra être entendu de la même façon les équivalents fonctionnels de ces virus ou de ces vecteurs. Plus particulièrement, le baculovirus ou les vecteurs
10 baculoviraux pourront être utilisés de la même façon que les adénovirus.

L'ensemble des fonctions rétrovirales, associé à un transgène, est transféré dans la cellule cible, simultanément ou séquentiellement, en utilisant les systèmes de transfection ou d'infection des vecteurs adénoviraux ou des adénovirus.

15 Les gènes accessoires des rétrovirus, à savoir tat, rev, vif, vpr, vpt peuvent être inclus ou exclus de la construction chimérique. L'exclusion ajoute à la sécurité virale du système.

Les fonctions virales d'encapsidation gag-pol et env. peuvent être portées par un seul vecteur adénoviral.

20 Cela présente néanmoins l'inconvénient de diminuer la flexibilité du kit. En effet, si env est porté par un vecteur séparé, il est possible de faire varier la nature du rétrovirus produit par les cellules en faisant varier l'origine du gène env introduit, ce qui n'est pas le cas quand les différentes fonctions sont portées par le même vecteur.

25 Aussi, un mode de réalisation préféré est-il de faire porter les éléments rétroviraux par trois vecteurs viraux distincts :

- le premier porteur des séquences régulatrices incluant le LTR, les séquences d'encapsidation Ψ ou un équivalent fonctionnel, et le transgène introduit de manière appropriée au niveau des sites de
30 restriction prévus à cet effet ;

- un vecteur viral porteur du gène gag-pol et un vecteur viral porteur du gène env.

Par vecteur viral, on entend de préférence un vecteur adénoviral ou un vecteur baculoviral, dont les structures et les performances sont bien documentées. Néanmoins, tout autre virus non
5 intégratif doit être considéré comme un équivalent fonctionnel d'un tel virus. L'homme du métier comprendra que tout virus capable d'infecter une cellule cible avec une multiplicité d'infections faible et capable d'exprimer les fonctions portées par son génome dans ladite cellule cible doit être
10 considéré comme équivalent fonctionnel de l'adénovirus. Aussi, dans le texte ci-après, on parlera de préférence de vecteur adénoviral, ou d'adénovirus.

Dans l'ensemble du texte, et afin d'alléger ce dernier, il est entendu que quand il sera question de vecteur adénoviral, il faudra
15 comprendre tant le vecteur lui-même administrable par transfection à la cellule cible que le virus contenant un génome porteur des mêmes séquences administrable par infection de la cellule cible.

De la même façon, par vecteur rétroviral susceptible de transfecter la cellule cible, il faudra entendre tant le vecteur administrable
20 par transfection que la particule virale dont le génome porte les mêmes séquences que le vecteur en question.

Dans le procédé ci-dessus, les étapes b) et c) peuvent être simultanées ou successives.

En effet, si l'on cherche à avoir un système de production de
25 particules rétrovirales transitoire, les trois vecteurs peuvent être transférés simultanément (ou les trois virus infecter les cellules simultanément). Si le titre obtenu est plus faible que celui obtenu après une expression stable, l'avantage est que la réponse sur le choix de la cellule cible est quasi-instantanée.

On peut également mettre au point un système d'expression stable par, dans un premier temps, transfection ou infection par le vecteur porteur du vecteur rétroviral (étape (b)), puis, après une quinzaine de jours, après intégration stable dans le génome dudit vecteur, la cellule cible peut
5 être infectée ou transfectée par les adénovirus ou les vecteurs adénoviraux porteurs des gènes de structure du rétrovirus (étape (c)). Les étapes (b) et (c) du procédé sont alors successives.

Dans le procédé de l'invention, les gènes gag-pol et env sont sous le contrôle de promoteurs susceptibles d'être activés dans la cellule
10 cible. On pourra choisir par exemple le promoteur du CMV pour gag-pol, le promoteur EF1 α pour env. L'homme du métier pourra sélectionner tout promoteur connu pour son efficacité dans la transcription des séquences qu'il contrôle.

Le transgène quant à lui sera sous le contrôle de séquences
15 régulatrices rétrovirales contenant les LTR, ou sous le contrôle d'un promoteur interne de type P.GK (Phospho glycerate kinase).

L'invention porte également sur un procédé pour établir une lignée cellulaire eucaryote apte à produire des particules rétrovirales à un titre supérieur à 10⁶ UI par ml et comprenant les étapes de :

20 (a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale ;

(b) transfection par un vecteur rétroviral porteur d'un transgène sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de
25 structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des séquences équivalentes ;

(c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence d'encapsidation et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence

issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences ;

(d) criblage des lignées productrices au titre recherché, sur la base du titre en rétrovirus obtenu dans le surnageant cellulaire.

5 Dans ce cas, le transgène présent dans le vecteur rétroviral sera de préférence un gène rapporteur permettant de sélectionner et de mesurer rapidement les lignées cellulaires produisant les rétrovirus au titre souhaité.

10 Comme pour le procédé de production décrit ci-dessus, les étapes b) et c) peuvent être simultanées ou successives selon que le procédé utilise une expression transitoire ou une expression stable du vecteur rétroviral dans les cellules cibles. Pour le criblage des lignées productrices, une expression transitoire sera recherchée.

15 De la même façon, afin d'éviter toute recombinaison homologue, les séquences portées par les adénovirus gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, sont portées par deux adénovirus distincts et sont de préférence d'origine rétrovirale différente. Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, l'étape préalable était la constitution et caractérisation fonctionnelle des adénovirus porteurs de gag-pol, d'une
20 part, et des adénovirus porteurs de env, d'autre part. La méthodologie d'obtention de ces virus ou de ces vecteurs adénoviraux est exposée ci-après dans les exemples. Des adénovirus recombinants particulièrement avantageux selon l'invention sont ceux dans lesquels gag-pol est issu du MoMLV et env est issu du rétrovirus GaLV (Gibbon Ape Lekemia virus). Le
25 gène env du virus de chat RD114 est également un bon candidat pour obtenir une reconstitution virale à haut titre et sans génération de virus "helper".

Un adénovirus ou vecteur adénoviral porteur de séquences rétrovirales sont appelés adéno-rétrovirus ou vecteur adénorétroviral.

Les adéno-rétrovirus recombinants utilisables dans les procédés de l'invention seront toujours sélectionnés par :

- la titration des surnageants rétroviraux obtenus après infection des cellules productrices, et son optimisation en fonction de la multiplicité d'infections adénovirales ;
- l'absence de rétrovirus "helper" dans le surnageant de production.

Toute combinaison gag-pol et env. sur un ou deux vecteurs adénoviraux, quelle que soit l'origine des gènes rétroviraux, qu'il y ait présence ou non d'une origine de réplication du SV 40 ou d'un site de polyadénylation ou de tout autre site utilisé de façon classique pour améliorer les performances des vecteurs ou des virus recombinants seront toujours criblés au vu des deux paramètres ci-dessus : titre et/ou absence de rétrovirus helper.

Dans les procédés de l'invention, toutes les cellules susceptibles à l'infection virale ou à la transfection peuvent être des bons candidats pour utiliser le procédé de production ou de criblage. Néanmoins, les capacités de production des cellules présentent une grande variabilité sans que l'origine de cette variabilité puisse être déterminée. Les cellules HeLA (ATCC n° CCL-2) et surtout les cellules hépatiques, dont un exemple est donné par les lignées d'hépatocarcinome HuH7 (NAKABAYASHI, H. et al., 1982, Cancer Research 42, 3858-3863) apparaissent être des producteurs particulièrement efficaces ; on peut également citer la lignée Ht 1080 CRL-8805 ; en revanche, un très faible transfert de gènes a été détecté en utilisant les cellules A549 (ATCC n° CCL-185.1).

L'invention porte également sur les lignées cellulaires hépatiques transfectées ou transformées par un vecteur rétroviral porteur des fonctions d'encapsidation et dépourvu des gènes de structures rétroviraux. Ledit vecteur peut être porteur d'un transgène dont l'expression

est recherchée dans une cellule cible, le transgène étant soit un gène d'intérêt pour la thérapie génique, soit un gène rapporteur pour des études, ou optimisation d'un procédé.

5 Dans le choix des cellules cibles, certaines lignées hépatiques apparaissent comme particulièrement performantes. Il s'agit des lignées HuH7 et Ht 1080 citées plus haut ou les lignées Hep 3B ou HEP G2, et dans lesquelles les vecteurs recombinants ont été transférés.

De manière plus générale, les lignées embryonnaires sont de bons candidats dans les procédés et kits selon l'invention.

10 L'utilisation de la lignée HuH7 dans les deux procédés décrits ci-dessus fait également partie de l'invention.

L'invention porte également sur une trousse pour la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène et comprenant au moins :

15 (a) un récipient contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène gag-pol ;

(b) un ou plusieurs récipients contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène env ;

20 (c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou contenant un rétrovirus défectif ou un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les séquences régulatrices, et des sites multiples de restriction permettant l'insertion d'un transgène ;

25 (d) le cas échéant, un récipient contenant un plasmide contrôle porteur d'un vecteur rétroviral, contenant au moins un gène rapporteur.

Dans la trousse selon l'invention les virus où les plasmides en a), b), c) ou d) ci-dessus sont de préférence sous forme congelée mais peuvent également être sous forme lyophilisée.

La trousse étant destinée à mettre en oeuvre le procédé décrit ci-dessus, les différentes possibilités de construction décrites plus haut sont bien sûr les modes préférés des plasmides ou des virus présents dans la trousse de l'invention, à savoir que gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, sont issus de rétrovirus différents. Par exemple, gag-pol est issu de MoMLV et sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus alors que env est issu de GaLV et est sous le contrôle du promoteur de EF1 α . Les séquences régulatrices et les séquences d'encapsidation rétrovirales du plasmide ou dans le virus décrit en c) sont de préférence issues de rétrovirus murins, et de lentivirus caprins, félins ou primates.

Enfin, le plasmide en c) porteur du vecteur rétroviral contient de préférence un marqueur de sélection.

Une trousse similaire pour l'établissement d'une lignée productrice de particules rétrovirales fait également partie de l'invention. Elle comprend au moins :

- (a) un récipient contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène gag-pol ;
- (b) un ou plusieurs récipients contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène env ;
- (c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou contenant un rétrovirus défectif ou un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les séquences régulatrices, et un gène rapporteur.

La souplesse d'utilisation des kits selon l'invention résulte entre autres du choix des cellules productrices. Toutes les cellules susceptibles à la transfection par les plasmides ou l'infection par les virus et plus particulièrement par les adénovirus et par les baculovirus peuvent être utilisées.

Plusieurs versions du kit peuvent être disponibles selon le choix de l'enveloppe rétrovirale choisie par l'utilisateur :

Il pourra s'agir d'un kit amphotrope lorsque l'adénovirus env correspondra à une enveloppe de l'amphotrope. Il peut également s'agir d'un kit GaLV lorsque l'adénovirus env codera pour l'enveloppe du rétrovirus de Gibbon. Il en est de même pour l'enveloppe RD 114, ECO, XENO ainsi que l'adénovirus codant pour l'enveloppe VSV-G.

Plusieurs conditionnements peuvent être proposés en fonction de la quantité des surnageants souhaitée :

- un kit mini comprenant 1 à 5 10^9 pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 50 ml de surnageants infectieux ;
- un kit "maxi" contenant 1 à 5 10^{10} pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 500 ml de surnageants infectieux ;
- un kit "méga" contenant 5 à 10 10^{11} pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 2 l de surnageants infectieux.

L'utilisation des kits selon l'invention peut se faire de plusieurs manières :

1) Il peut permettre de créer une population de cellules exprimant en stable le vecteur rétroviral porteur du transgène. Le plasmide est alors transfecté de préférence avec un marqueur de sélection de type néomycine ou blasticidine. Au bout de deux semaines de culture en présence de la drogue, la population est constituée. Si le transgène code pour une protéine visualisable en cytométrie de flux, elle peut être triée plus avant.

Après quoi, la lignée exprimant de façon stable le vecteur rétroviral sera infectée par les adénovirus d'encapsulation gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, contenus dans les récipients en a) et b) ci-dessus. Le lendemain, le milieu de culture est changé. Il est recueilli, filtré et prêt à être utilisé le jour d'après et tous les jours pendant quatre jours.

2) Le vecteur rétroviral est transfecté dans les cellules choisies au moment de la co-infection avec les adénovirus d'encapsulation. Le milieu de culture est changé le lendemain et le surnageant est recueilli 24 heures après. Les cellules cibles qui présentent alors une expression
5 transitoire permettent néanmoins très rapidement de connaître les capacités de production de ces cellules.

Les procédés et les kits de l'invention sont avantageusement utilisés dans les cas suivants :

(a) production de vecteurs en temps limité et à faible coût :
10 la flexibilité du kit et la rapidité d'obtention des résultats en fait un outil de choix pour les scientifiques cherchant à produire des rétrovirus recombinants ;

(b) application au transfert de gènes ex vivo, par exemple dans des cellules hématopoïétiques. Les cellules souches
15 hématopoïétiques du sang périphérique sont considérées comme des cibles importantes pour les approches de thérapie génique liées au traitement des désordres hématologiques, incluant les maladies héréditaires. En particulier, cette approche est largement utilisée avec l'objectif de traiter par thérapie génique les tumeurs ou les cancers, après
20 la mobilisation du système avec le GCSF. L'application du kit selon l'invention au transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques de type CD34+ peut permettre de combiner les avantages de deux systèmes de co-culture :

- celui des cellules souches CD34+ sur un tapis de cellules
25 stromales créant un micro-environnement médullaire producteur de cytokines (Nolta, Chi.A. et al, Blood 86:101-110, 1995) ;

- co-culture des cellules souches hématopoïétiques avec des cellules productrices de rétrovirus réalisée selon le procédé de l'invention et favorisant la transduction par contact direct cellule-cellule (Germeaad
30 W.T., et al, Blood, 84:780-788, 1994).

En pratique, un stroma humain primaire sera cultivé in vitro en respectant sa capacité à soutenir l'hématopoïèse. Il sera ensuite infecté avec les adénovirus portant les fonctions d'encapsidation et le vecteur pour le rendre producteur de particules rétrovirales infectieuses. La transduction des CD34+ sera alors réalisée par co-culture des cellules souches sur le tapis stromal génétiquement modifié, en l'absence de cytokines exogènes.

Les matériels et méthodes, protocoles et exemples ci-après pourront, sans être limitatifs, montrer la performance des procédés de l'invention et des kits pour la sélection de cellules hautement productrices de rétrovirus recombinants.

Légendes des figures

La Figure 1 représente le vecteur MoMLV gag-pol.

La Figure 2 représente le gène env de GALV sous le contrôle du promoteur du facteur humain d'élongation EF1 α .

La Figure 3 représente le mCD2 inséré dans le vecteur rétroviral, sous le contrôle d'un LTR.

La Figure 4 représente un Western Blot réalisé avec un anticorps anti-p30 sur des extraits cellulaires indiquant la synthèse de la protéine gag-pol après infection par l'adénovirus gag-pol.

La Figure 5 représente le Western Blot obtenu avec un anticorps anti-gp70 exprimant la synthèse de la protéine d'enveloppe après infection par l'adénovirus env.

La Figure 6 représente les profits obtenus en cytométrie de flux des cellules exprimant le mCD2 en fonction de la multiplicité d'infection. Des surnageants de culture de cellules Te-FLY-GALV infectées par AdmCD2 ont été utilisés pour transduire mCD2 dans les cellules Te671.

La Figure 7 représente les profits en cytométrie de flux obtenus après infection de différents types de lignées cellulaires, soit deux jours après l'infection (Figure 7A), soit 21 jours après l'infection (Figure 7B).

Matériels et Méthodes

Constructions adénovirales portant les séquences rétrovirales

Les fonctions d'encapsidation gag-pol et env, le marqueur d'infection adénovirale et le vecteur rétroviral ont été clonés
5 indépendamment les uns des autres, entre deux sites de restriction uniques. Les différentes cassettes peuvent donc être sorties facilement des plasmides intermédiaires pour être ensuite insérées dans les plasmides navettes définitifs.

Une cassette d'expression pour la chaîne α du récepteur à
10 l'interleukine 2 sera associée à la cassette gag-pol (il s'agit de la chaîne courte du récepteur membranaire qui n'est pas capable de déclencher, seule, une réponse intracellulaire après fixation de l'IL2). Elle permettra de suivre l'infection adénovirale.

Construction des cassettes d'expression gag-pol

En fait, trois unités différentes ont été construites, pour pallier
15 à d'éventuelles interférences entre les épissages différentiels adénovirus/rétrovirus. Toutes sont dépourvues du signal d'encapsidation ψ . Deux d'entre elles sont également dépourvues du site donneur d'épissage (sd^+), avec délétion ou non du site accepteur (sa^- et sa^+) situé à la fin de
20 pol.

Lignées cellulaires utilisées

Les lignées cellulaires A549, HuH7, HeLa, HT1080, 293, ont déjà été décrites et font l'objet de dépôt à l'ATCC. Les cellules Te671 et leurs clones dérivés transcomplémentants ont été décrits dans COSSET,
25 F.L., et al., 1995 J. Virol., 69, 7430-7436. Brièvement, TeLFBASAF exprime de manière stable les protéines d'enveloppe amphotrope et le vecteur rétroviral LacZ. TeLCeB6 exprime de manière stable tant les protéines gag-pol de Mo-MLV que le vecteur LacZ. TeLacZ exprime uniquement le vecteur rétroviral LacZ. TeFLY-GALV exprime le gène gag-
30 pol de Mo-MLV et la protéine d'enveloppe GALV. Finalement, les lignées

cellulaires TG18 produisent des particules rétrovirales du pseudo type GALV codant pour la protéine nucléaire LacZ. Toutes ces cellules sont mises en culture dans du milieu de DMEM, Sigma (milieu Eagle modifié par Dulbecco) supplémenté en 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules Vero sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal.

Les plasmides

Le plasmide navette de base pAd-Swal est dérivé du vecteur adénoviral pAd-BgIII, et est constitué de l'ITR en 5' et des séquences d'encapsulation (1-400 pb) suivies par la région 9-16 mu de l'adénovirus humain type 5. Le polylinker NotI-EcoRV extrait du vecteur pAd-CMVlink a été inséré à la place du site BgIII. Finalement, un site de restriction Swal a été introduit en amont de l'ITR en 5'. Le plasmide peut ainsi être linéarisé par Swal ou NheI.

La cassette d'expression gag-pol a été dans un premier temps sous-clonée dans le plasmide Bluescript BS-KS+ II (Stratagene) pour donner le plasmide pBGP. La région NotI-EcoRI du plasmide hCMV-intron gag-pol, incluant le promoteur, le gène rétroviral et le gène de résistance à l'antibiotique blasticidin *bsr* (Cosset et al, 1995) a été inséré dans les sites correspondants de BS (plasmide pBGP-*bsr*). Le signal de polyadénylation de SV40 a été amplifié par PCR à partir du plasmide hCMV-intron gag-pol en utilisant les amorces suivantes :

5'-GGATCGATCTAGAGATCATAATCAGCC et

3'-GGGAATTCGATCCAGACATGATAAG,

dans le but d'introduire les sites de restriction *ClaI* et *EcoRI*. Un fragment pol de 472 pb a été obtenu par PCR avec le plasmide précédent comme matrice et en utilisant les amorces suivantes :

5'-GGATTCCGAGCCCGCAACACG (précédant le site accepteur de d'épissage) et 3'-ATCGATTAGGGGGCCTCGCGGG, conférant un site *ClaI* en aval du codon stop de pol. Ce fragment a été digéré avec *SfiI* et *ClaI*,

alors que le signal de polyadénylation de SV40 a été digéré avec *Clal* et *EcoRI*. Ils ont été insérés par une ligation des deux fragments de PCR dans le plasmide pBGP-bsr, digéré par *SfiI-EcoRI*, à la place du gène *bsr*. Cette unité gag-pol de 6,4 kb a finalement été extraite de pBGP avec *NotI* et *EcoRI*, modifiée par l'ADN I polymérase de Klenow et insérée dans le plasmide *BamHI*, digéré avec pAd-Swal en utilisant des linkers *BclI*.

Le promoteur humain EF1 α inclut le premier exon non codant, un intron et la partie 5' du deuxième exon coupé en aval du site ATG. Le promoteur a été extrait avec *HindIII* et *XbaI* du plasmide pKREFhu, et cloné dans les sites correspondants du plasmide pSP72 (PROMEGA). Le signal de polyadénylation décrit ci-dessus a été inséré aux sites *XbaI* et *EcoRI*.

Le plasmide pEGA exprimant le gène env de GALV a été digéré avec *SacII*, traité à la polymérase de Klenow et ligué avec des linkers *XbaI*. Le gène de 2,1 kb a ensuite été extrait avec *XbaI* et inséré entre le promoteur HuEF1 α et le signal de polyadénylation de SV40 pour donner le plasmide pCE. Cette unité de 4 kb a été finalement extraite avec *HindIII* et *Clal*, traitée à la polymérase de Klenow et insérée dans le plasmide pAd-Swal digéré par *BamHI* en utilisant les linkers *BclI*.

Les vecteurs rétroviraux MFG contenant le CD2 murin ont déjà été décrits (DRANOFF, G., et al., 1993, P.N.A.S., 90, 3539-3543). Le vecteur de 4 kb a été extrait par *SspI* et inséré dans le plasmide pAd-Swal digéré par *BamHI* en utilisant les linkers *BclI*.

Construction des adénovirus recombinants

Les adénovirus recombinants délétés E1/E3 ont été réalisés en utilisant le mutant adénoviral dl327 contenant une délétion complète de la région E3. En bref, 10 μ g de plasmide navette ont été linéarisés avec, soit *SwaI* ou *NheI* et co-transfectés dans les cellules 293 avec 2 μ g d'ADN, de dl327 digéré par *Clal*. Chaque adénovirus recombinant a ensuite été purifié par quatre cycles de purification en plaques et confirmé par des tests de production fonctionnels tels que décrits ci-dessous. Des virus

compétents pour la réplication sont finalement propagés sur des cellules 293 et purifiés deux fois par centrifugation en gradient de chlorure de césium. La concentration des particules virales par ml a été déterminée par spectrophotométrie. Les stocks d'adénovirus ont été titrés en plaques en infectant des cellules 293 avec des dilutions en série dans du milieu DMEM supplémenté avec 2 % de sérum de veau pendant deux heures. Les milieux sont ensuite éliminés avant le recouvrement par les virus. Le nombre d'unités formant plaques par ml (pfu/ml) a été compté six jours plus tard.

Mesures de la production de rétrovirus

Les tests de production de particules rétrovirales sont réalisés par infection des cellules de pré-packaging par les adénovirus recombinants. Les cellules TeLCeB6, qui expriment en stable le vecteur NLS LacZ et la région gag-pol, sont infectées par l'adénovirus recombinant portant l'enveloppe et le vecteur rétroviral. De la même façon, les cellules TeLFBASF, qui expriment en stable le vecteur NLS LacZ et l'enveloppe amphotrope, sont infectées par les adénovirus portant la région gag-pol.

Ces cellules de pré-packaging sontensemencées à $4 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Le lendemain, elles sont infectées par les adénovirus recombinants à différentes multiplicités d'infection (MOI) pendant deux heures dans 1 ml de milieu DMEM contenant 2 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du PBS, et laissées dans 2 ml de DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal pendant 24 heures supplémentaires. Les cellules sont changées pour la nuit. Finalement, deux jours après l'infection avec les adénovirus, les surnageants de culture sont récoltés, filtrés à $0,45 \mu\text{m}$ et analysés pour la présence de particules rétrovirales infectieuses. Les cellules productrices sont analysées quant à leur production de protéines gag, env ou CD2. Dans un autre mode de réalisation, les cellules infectées

peuvent être maintenues en culture pour des essais de production rétrovirale à long terme.

Titration des vecteurs codant pour NlsLacZ

Pour le titrage des particules rétrovirales codant pour NlsLacZ, des cellules Te671 ont étéensemencées à 5×10^4 cellules par puits dans des plaques à 24 puits la veille de la transduction. Elles sont incubées pendant quatre heures avec des dilutions en série des surnageants infectieux contenant 8 μg de Polybrene par ml. Après changement du milieu de culture, les cellules sont laissées pendant deux jours. Elles sont ensuite fixées avec 2 % de glutaraldéhyde et colorées avec 5 mM $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ -5 mM $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ -2 mM MgCl_2 -1 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) (Promega) pendant 6 heures. Le nombre des colonies positives est compté en unités internationales par ml (IU/ml).

Cytométrie de flux

Les cellules productrices infectées avec des adénovirus recombinants porteurs du MFGmCD2 sont récoltées dans du PBS, 2 mM EDTA et incubées avec 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules avec un anticorps monoclonal purifié de rat contre le CD2 de souris (Cliniscience) pendant 1 heure, à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées avec 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules de fragment F(ab')_2 purifié conjugué au FITC et dirigé contre les IgG de rat (Bioatlantique, France) pendant 1 heure, à 4 °C. Après le dernier lavage en PBS, elles sont colorées avec 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodure de propidium (PI), pour discriminer la population viable (PI négative) des cellules mortes (PI positive) conduisant à la réduction du bruit de fond de fluorescence non spécifique. Le marquage au FITC de 10^4 cellules viables est analysée par cytométrie de flux.

Western blotting

Des lysats cellulaires sont préparés dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 %, Triton X100, sodium dodecyl sulfate 0,5 %, ...

sodium deoxycholate 0,5 %, 150 mM NaCl, 1 mM phénylméthylsulfonyl
fluoride, 1X d'un cocktail inhibiteur de protéases (Boehringer Mannheim).
Après une séparation en électrophorèse de gel de polyacrylamide en
sodium dodécyl sulfate 10 % et transfert sur des membranes de nitro-
cellulose Hybond (Amersham), l'immunoblott a été réalisé en utilisant un
anticorps monoclonal anti-p30 (?) ou un anticorps monoclonal anti-gp70
amphotrope. Des anti-anticorps de chèvre marqués à la peroxydase ont été
utilisés pour l'immuno-détection en chimio-luminescence.

Exemples de réalisation

10

Exemple 1

Caractérisation fonctionnelle des adénovirus porteurs de gag-pol (Ad gag-pol)

(a) Obtention des adénovirus recombinants

Pour éviter une éventuelle interférence entre les deux
systèmes d'épissage viraux contraire à la production des adénovirus
recombinants, deux cassettes d'expression gag-pol ont été construites. La
première porte la séquence nucléique sauvage de Moloney MLV (gag-pol
SA+), et la deuxième porte une séquence modifiée au niveau du site
accepteur d'épissage présent à la fin de pol mais respectant le cadre de
lecture normal (gag-pol SA-). Le gène gag-pol de Mo-MLV est placé sous
le contrôle du promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV). Cet
ensemble est inséré au site de la région E1 du génome adénoviral,
conduisant à des virus défectifs pour sa réplication. Plusieurs clones
adénoviraux ont été obtenus après co-transfection des cellules 293 (E1+)
avec les plasmides navettes et le génome Ad327 tronqué de la partie
5'ITR. Huit d'entre eux ont été testés dans les essais de production
rétrovirale, après infection des cellules trans-complémentantes TeL-
FBASAF, qui expriment en stable l'enveloppe amphotrope et le vecteur
NisLacZ. Tous étaient positifs. Le clone 3 (Adgag-pol SA+) et le clone 6
(Adgag-pol SA-) ont été purifiés par quatre plaquings successifs sur les

cellules 293. L'amplification finale sur 20 boîtes de culture de 150 mm a permis l'obtention de deux stocks d'adénovirus titrant indifféremment à $5,0 \cdot 10^{10}$ pfu/ml. La présence du site accepteur d'épissage sauvage n'a donc finalement pas d'effet négatif sur la production adénovirale. Les virus
5 seront désignés par la suite sous la forme générique Adgag-pol.

(b) Production des particules rétrovirales

Les tests de production de particules rétrovirales après infection par Adgag-pol ont été analysés en infectant des cellules trans-complémentantes TeLBASAF, dérivées des Te671 et exprimant en stable
10 l'enveloppe amphotrope et le vecteur LacZ. Les conditions optimales de production rétrovirale ont été déterminées par infection des cellules TeLBASAF avec des quantités croissantes d'Adgag-pol. Deux jours après l'infection, les niveaux d'expression de gag-pol ont été analysés par Western Blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de capsid p30.
15 L'anticorps permet également l'immuno-détection du précurseur non clivé de gag Pr65 ou des polypeptides partiellement digérés. Les niveaux de la synthèse de Pr65 dans les cellules infectées par Adgag-pol sont au moins égaux à ceux détectés dans les cellules d'empaquetage stable FLY-GALV, cellules dérivées des Te671 exprimant gag-pol et l'enveloppe du
20 Gibbon ape leukemia virus GALV (Porter CD, C.M., Taylor CS, Parkar MH, Cosset FL, Weiss RA, Takeuchi Y., Hum. Gene Ther. 7, 913-919 (1996)). La synthèse de la Pr65 augmente avec la m.o.i. lorsqu'on travaille avec de faibles quantités d'adénovirus (m.o.i. de 5 à 10). Cette observation peut s'expliquer par un nombre croissant de cellules réellement transduites. La
25 figure 4 représente le Western Blot réalisé avec un anticorps anti-p30 sur les extraits cellulaires (10^5 cellules par piste). La piste (+) est un contrôle positif TeFLY-GALV. La piste (-) est un contrôle négatif TeL-FBASAF non infectées. Les pistes 5 à 50 indiquent le résultat obtenu avec TeL-FBASAF infectées avec m.o.i. croissantes en Ad gag-pol.

Par contre, la quantité de Pr65 produite reste stable pour des m.o.i. variant jusqu'à 250. Ce résultat, indépendant de l'effet cytopathique observé pour les m.o.i. plus fortes, est plus inattendu.

La production des rétrovirus par les TelfBASAF infectées par l'Ad gag-pol a été analysée par titration des surnageants de culture selon la technique décrite ci-dessus dans Matériels et Méthodes.

Le titre obtenu est approximativement de 10^6 Ifu/ml, pour des m.o.i. variant de 10 à 500 en adénovirus (tableau 1 ci-dessous). Il est maximal les deuxième et troisième jours après infection des producteurs (colonnes J2 et J3) quelle que soit la quantité d'Adgag-pol utilisée. Il décroît à partir du quatrième jour (colonne J4), même aux m.o.i. les plus faibles pour lesquelles un effet cytopathique n'est pas observé.

Tableau 1 : Production de particules rétrovirales avec l'adénovirus Ad gag-pol

m.o.i. en Adénovirus Adgag-pol	Titre J1 p.i.	Titre J2 p.i.	Titre J3 p.i.	Titre J4 p.i.
ADN	$1,7 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$
10	$4,3 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^5$
50	$1,4 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^5$
100	$1,2 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^5$
250	$1,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$	$\text{inf } 10^4$
500	$1,3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^5$	$\text{inf } 10^4$

On observe également une saturation de la production de particules rétrovirales à partir de la m.o.i. 50. Est-elle due à la saturation de la synthèse des protéines gag remarquée en Western Blot, ou le système

TeL-FBASAF est-il lui-même limitant ? Quel que soit le facteur responsable de la saturation, cette méthode de production transitoire augmente le titre des surnageants infectieux d'un facteur 100 à 1000 par rapport à la simple transfection du plasmide portant la cassette d'expression de gag-pol dans les cellules complémentaires (ligne DNA).

La recherche de rétrovirus compétents pour la réplication sur les surnageants TeL-FBASAF infectées n'a montré aucun événement de recombinaison entre la cassette gag-pol et l'enveloppe intégrée dans le génome cellulaire (travaux réalisés par F.L. Cossett, Lyon). Les tests ont pourtant été faits dans les conditions les plus favorables à l'émergence de virus helper : grand nombre de copies gag-pol présentes dans les cellules, et utilisation de l'enveloppe amphotrope de MLV dont la séquence nucléique chevauche avec celle de pol. De même, aucune encapsidation non spécifique de l'ARN gag-pol n'a pu être mise en évidence dans les surnageants de culture. Le système de production est donc efficace, rapide et sûr.

Exemple 2

Caractérisation fonctionnelle des adénovirus portant la fonction env

1. Obtention et purification des adénovirus recombinants

Le gène codant pour l'enveloppe de GALV (fragment SacII-XbaI SacII-XbaI) a été cloné entre le promoteur du facteur d'élongation humain EF1a (issu du plasmide pKREFhu (référence)) (Fig. 2). La production d'adénovirus recombinants permet d'obtenir des titres de l'ordre 2×10^{11} pfu/ml.

La génération d'adénovirus portant la cassette d'expression de l'enveloppe GALV et le vecteur VL30-mCD2 s'étant avérée délicate, les deux fonctions ont été placées sur des vecteurs adénoviraux distincts.

Pour construire le vecteur porteur de mCD2 et représenté sur la figure 3, la région psi/SD+/SA+ du vecteur MFG-mCD2 a été remplacée

par la région d'encapsidation et dimérisation de rétro-transposons virus-like VL30 (fragment XbaI-BamHA, issu du plasmide pCO6-HX (figure 3)).

2. Production de particules rétrovirales

Des stocks d'adénovirus titrant à $2,0 \cdot 10^{11}$ pfu/ml ont été
5 obtenus.

L'analyse de l'adénovirus Ad GALVenv est analogue à celle faite sur l'adénovirus Ad gag-pol. Les cellules complémentantes sont les TeLCeb6, dérivées des Te671 exprimant en stable gag-pol de MoMLV et le vecteur MFG-LacZ (Cosset F.L. et al, J. Virol. 1995, 69:7430-7436).

10 La synthèse de l'enveloppe a été étudiée par Western Blot et le résultat représenté sur la figure 5 qui représente le Western Blot réalisé avec un anticorps anti-gp70 amphotrope sur des extraits cellulaires (10^5 cellules par piste). Dans la Figure 5A, la piste (+) est un contrôle positif TeFLY-GALV. La piste (-) est TeL-Ceb6 non infectées. Les pistes 5 à 1000
15 sont TeL-Ceb6 infectées avec des m.o.i. croissantes en Ad GALVenv. La Figure 5B représente l'agrandissement des pistes 250 et 500, exposition du film réduite.

Un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de l'enveloppe amphotrope (sous-unité SU) a été utilisé puisqu'aucun anticorps dirigé
20 contre le pseudotype GALV n'est disponible. Cette étude n'est pas optimale, car la réaction croisée avec l'antigène de singe est assez faible. C'est pourquoi la protéine n'est pas détectée dans un extrait cellulaire de producteurs stables FLY GALV (figure 5A). Par contre, le Western Blot montre une synthèse forte et croissante de la protéine d'enveloppe dans
25 les cellules infectées par l'adénovirus Ad GALVenv. Malgré son intensité inattendue, le signal observé est spécifique de la gp70. Il n'est pas dû à une réaction croisée de l'anticorps avec une protéine adénovirale apportée par l'infection, puisqu'il n'est pas retrouvé avec des extraits cellulaires de TeLCeb6 infectées par un adénovirus contrôle CMV-LacZ. Les deux
30 bandes rapprochées observées par Western Blot pourraient correspondre

au peptide précurseur Pr85 et à la forme mature gp70 (figure 5B). Ceci plaide en faveur d'un adressage correct de l'enveloppe à la surface de membranes plasmique, puisque le clivage SU/TM sensé libérer le domaine de fusion est nécessaire à la translocation du polypeptide (Zhu N.L. et al, J. Virol. 1998, 72:1632-1639).

L'analyse de la production rétrovirale montre une saturation du système TeLCeb6. Le titre maximal en particules LacZ infectieuses est obtenu pour les faibles m.o.i. en Ad GALVenv (tableau 2 ci-dessous).

Tableau 2 : Production de particules rétrovirales avec l'adénovirus Ad GALVenv

m.o.i. en Adénovirus Ad GALVenv	Titre en IU/ml (deux jours post-infection)
ADN	4,0 10^4
10	4,7 10^6
25	5,0 10^6
50	3,4 10^6
100	1,0 10^6
250	9,0 10^5
Plasmide	4 10^4
TG18	4,6 10^6

Alors que la transfection des cellules TeLCeb6 avec un plasmide codant pour l'enveloppe de GALV donne des sumageants titrant à 4×10^4 IU/ml, des titres de 4 à 5×10^6 IU/ml ont été obtenus deux jours après l'infection adénovirale avec des m.o.i. entre 10 et 50. Un tel système transitoire permet d'obtenir une production rétrovirale équivalente à la lignée stable productrice TG18.

Pour des m.o.i. supérieures, les titres décroissent en proportion d'un effet cytopathique, qui peut être sans doute corrélé à

l'expression de protéine adénovirale précoce et tardive détectée par immunocytochimie.

Là encore, aucun rétrovirus compétent pour la réplication n'a pu être détecté par les tests LacZ.

5

Exemple 3

Production de particules rétrovirales par co-infection avec les adénovirus gag-pol et env

Les conditions optimales de production ont été déterminées en infectant les cellules TeLacZ trans-complémentantes, dérivant de Te671 et exprimant de façon stable le vecteur rétroviral (COSSET, F.L., et al., 1995, 69, 7430-7436). Deux jours après l'infection des cellules TeLacZ, des titres supérieurs à 10^6 IU/ml ont été obtenus quand les deux m.o.i. se situent entre 50 et 100. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation évidente entre la production de rétrovirus et les rapports entre les deux adénovirus Aggag-pol; et Ad env, l'analyse de la production de rétrovirus au cours du temps a été réalisée avec des m.o.i. égales pour les deux virus.

15

Le tableau 3 ci-dessous indique la production de rétrovirus en fonction de la multiplicité d'infection des deux adénovirus Adgag-pol et Ad env.

20

Tableau 3 : rétrovirus les 2ème, 3ème et 4ème jours après l'infection adénovirale

m.o.i. AdGALVenv et Adag-pol	Titres rétroviraux (IU/ml) les jours suivants l'infection adénovirale		
	2	3	4
5/5	$4,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$
10/10	$9,6 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
50/50	$3,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$
100/100	$1,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$

TG18	$2,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
------	-------------------	-------------------	-------------------

Les titres rétroviraux diminuent au cours du temps, et ceci indépendamment des m.o.i. des adénoviraux et en l'absence des faits cytopathiques. Néanmoins, l'infection de cellules productrices avec des m.o.i. de 50 conduit à des titres de 2×10^6 IU/ml pendant deux jours.

Aucun rétrovirus compétent pour la réplication n'a pu être détecté dans les surnageants de cultures cellulaires récoltées deux et trois jours après l'infection.

Exemple 4

Caractérisation fonctionnelle de l'adénovirus Ad-MCD2

1. Obtention des adénovirus recombinants Ad VL30mCD2 et Ad MFG-mCD2 représentés dans la Figure 3

Un vecteur rétroviral MFG codant pour l'antigène de surface CD2 murin a été décrit (Champsex et al, 1996 ...). Le vecteur a donc été inséré dans le génome adénoviral délété de la région E1, et des stocks de virus Ad MFG-mCD2 a été amplifié, titrant à 2×10^{10} pfu/ml.

2. Production de particules rétrovirales avec Ad MFG-mCD2

Les Te-FLYA ont été infectées avec des m.o.i. croissantes en Ad MFG-mCD2 purifié. Dès la m.o.i. de 5, la population est globale mCD2 positive (Figure 6A) contrairement à ce qu'indique les clones producteurs contrôle (Figure 6B). Elle devient plus homogène avec des charges plus élevées en adénovirus, mais les cellules présentent un effet cytopathique précoce pour des m.o.i. supérieures à 50.

L'analyse des cibles montre une transduction de 3 à 9 % des cellules, (Tableau 4 ci-dessous). Le contrôle des FLYA transfectées avec le plasmide portant le vecteur ne donne pas de transduction décelable.

Tableau 4 : Production rétrovirale par les Te-FLYA infectées avec l'Ad MFG-mCD2

m.o.i. en Adénovirus Ad MFG-mCD2	% de Cellules Cibles mCD2+	Effet cytopathique (deux jours post-infection)
DNA	0.03	—
5	3.5	—
10	5.4	—
25	7.3	—
50	8.1	+
100	9.7	++
250	N.D.	+++

De façon surprenante, alors que les clones producteurs infectés à des m.o.i. jusqu'à 50 expriment des niveaux élevés de mCD2, les cellules transduites n'excèdent pas 10 % de la population totale. Cependant, une augmentation de la multiplicité d'infection des adénovirus conduit à une transduction plus efficace allant jusqu'à 24 % des cellules positives. En revanche, aucun transfert de gènes mCD2 n'a pu être détecté avec les cellules productrices TeFLY-GALV transfectées.

Exemple 5

Production de particules rétrovirales avec Ad gag-pol, Ad GALVenv et Ad mCD2

Les Te671 ont été infectées avec les trois adénovirus simultanément, avec des m.o.i. de 10 ou 50 pour les fonctions de packaging, et des m.o.i. de 10, 25 et 50 pour le vecteur. On retrouve des niveaux de transduction de 8-10 % comparables à ceux obtenus sur les

producteurs stables Te-FLYGALV (Tableau 5, les deux dernières lignes) ou Te-FLYA (Tableau 4) infectés avec l'adénovirus Ad MFGmCD2 seul.

5 Tableau 5 : Production rétrovirale par le Te671 infectées les trois adénovirus

m.o.i. en Ad gag-pol et Ad GALVenv	m.o.i. en Ad MFG-mCD2	% de Cellules cibles mCD2+
10/10	10	8
10/10	50	4,4
25/25	10	8,7
25/25	50	8,9
50/50	10	8,2
50/50	50	10,6
—	10	3,5
—	50	9,4

10 L'analyse en cytométrie de flux des Te671 cibles maintenues en culture dix jours après l'infection rétrovirale montre une expression constante de mCD2 (données non présentées). La population cellulaire garde 10-11 % de cibles exprimant le transgène. Ce résultat indique que le transfert du gène est stable, et n'est pas le fait d'une contamination des surnageants rétroviraux par les adénovirus Ad MFGmCD2.

Exemple 6

15 **Screening des lignées cellulaires combinant la permissivité à l'infection adénovirale et des hauts titres de production rétrovirale**

La production rétrovirale in vitro a été analysée par l'infection simultanée des cellules avec les trois adénovirus recombinants. Afin de comparer cette production à celle obtenue avec les cellules TeFLY-GALV.

infectées par AdmCD2, dans le même contexte cellulaire, les cellules Te671 ont d'abord été infectées avec des m.o.i. croissantes de Adgag-pol, AdGALV env et AdmCD2. Deux jours après l'infection, les cellules cibles sont incubées avec les surnageants de cultures infectieux, en présence
5 d'anticorps bloquant les adénovirus. Là encore, bien que les cellules productrices exprimant l'antigène CD2, quelle que soit la multiplicité d'infection adénovirale, ont été utilisées, la transduction apparaît être dépendante de la multiplicité d'infection. La fraction des cellules cibles positives exprimant le marqueur se situe entre 1,5 et 24,3 % de la
10 population totale (Figure 7A). Les cellules infectées par le surnageant sont maintenues en culture pendant trois semaines de plus et analysées quant à l'expression de l'antigène mCD2 à long terme. Des populations cellulaires positives sont toujours détectées, confirmant que l'induction de mCD2 résulte de la transduction rétrovirale et non de la transduction adénovirale
15 (Figure 7B).

Il faut souligner que les niveaux de mobilisation de mCD2 sont comparables à ceux obtenus après l'infection des cellules TeFLY-GALV avec AdmCD2 seul. Il a été précédemment observé que
20 l'augmentation, tant des fonctions gag-pol que env ou de l'expression du vecteur, n'augmente pas les titres rétroviraux, comparé à ce qui se passe dans les lignées productrices stables. Dans le procédé mis en oeuvre ici, la surexpression des fonctions d'empaquetage et du vecteur rétroviral n'est pas suffisante pour surmonter le phénomène de saturation. Si la cause
25 d'une telle limite reste non déterminée, la flexibilité de notre système de production transitoire nous a permis de sélectionner différentes lignées cellulaires avec les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

Les lignées cellulaires humaines ont été testées préférentiellement, car les particules produites à partir de telles lignées présentent une sensibilité réduite au complément du sérum. Des lignées
30 A549 infectées par l'adénovirus sont des mauvais candidats, car elles

présentent une production faible avec environ 3 % des cellules cibles transduites (Figure 7B).

En revanche, les cellules HeLa et surtout les cellules d'hépatocarcinomes HuH7 apparaissent être de bons ou même
5 d'excellents producteurs, dans la mesure où 37,6 % et 61,9 % de cellules positives pour mCD2 ont été détectées respectivement dans ces deux lignées après incubation avec les surnageants infectieux.

Tant pour les cellules HeLa que pour les cellules HuH7, les populations transduites restent stables après 21 jours de culture in vitro,
10 confirmant que le transfert de gènes mCD2 n'a eu lieu que par le biais de la transduction rétrovirale. Les hauts titres de production de rétrovirus ne semblent pas être reliés à une quelconque permissivité cellulaire particulière à l'infection adénovirale, puisque les essais de production utilisant les cellules Vero hautement productives ne permettent pas
15 d'obtenir une transduction améliorée du rétrovirus. Au contraire, moins de 8 % de cellules positives ont été détectées avec les cellules Vero.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des particules rétrovirales, à un titre supérieur à 10^6 UI/ml et comprenant les étapes de :
- 5 (a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,
- (b) transfection par un vecteur rétroviral porteur d'un transgène sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le
- 10 génome est porteur des séquences équivalentes,
- (c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence d'encapsidation et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence
- 15 issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences
- (d) criblage des lignées productrices au titre recherché,
- soit sur la base du titre rétroviral obtenu dans le surnageant
- 20 cellulaire,
- soit sur la base de l'absence de virus helper dans le surnageant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce
- 25 que la lignée cellulaire est d'origine hépatique ou embryonnaire.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le transgène est un gène rapporteur.

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles gag-pol est issu d'un lentivirus et env est issu de la protéine G de VSV-G sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

5. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que dans l'étape (c) gag-pol et env sont portés par deux vecteurs différents ou deux constructions virales différentes.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les vecteurs viraux ou les virus sont d'origine adénovirale ou baculovirale.

7. Procédé de production de rétrovirus recombinants porteurs de gènes d'intérêt à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant :

(a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,

(b) transfection par un vecteur porteur d'un gène d'intérêt sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des mêmes séquences que ledit vecteur,

(c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence psi et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences,

(d) la culture de ces cellules dans un milieu approprié à la récolte des particules rétrovirales porteuses du transgène.

5 8. Procédé selon la revendication 7 dans laquelle gag-pol est issu d'un lentivirus et env est issu de la protéine G de VSV-G sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

10 9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les étapes (b) et (c) sont successives.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les étapes (b) et (c) sont simultanées.

15 11. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur en (b) est un vecteur adénoviral ou baculoviral.

12. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur en (b) est un vecteur rétroviral.

20 13. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que le vecteur non rétroviral en (c) est un vecteur adénoviral.

25 14. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que le vecteur non rétroviral en (c) est un baculovirus.

30 15. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les séquences rétrovirales gag-pol et env sont portées par deux vecteurs distincts.

16. Procédé selon l'une des revendications 7 à 15, caractérisé en ce que gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.

5

17. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que env est issu du GaLV et est sous le contrôle du promoteur EF1.

10

18. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que le transgène est sous le contrôle d'un LTR rétroviral.

15

19. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que le transgène est sous le contrôle d'un promoteur interne.

20. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules hépatiques.

20

21. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules embryonnaires.

22. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules HuH7.

25

23. Lignée cellulaire hépatique HuH7 dans laquelle ont été transférées par transfection ou infection des fonctions rétrovirales d'encapsidation, des fonctions rétrovirales de régulation, et des sites de restriction permettant l'insertion d'un transgène.

30

24. Trousse pour la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène comprenant au moins :

(a) un récipient contenant un virus non rétroviral ou un plasmide porteur d'un gène gag-pol,

5 (b) un ou plusieurs récipients contenant un virus non rétroviral ou un plasmide viral porteur d'un gène env,

(c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou un rétrovirus défectif ou contenant un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les
10 séquences régulatrices, et des sites multiples de restriction permettant l'insertion d'un transgène,

(d) le cas échéant, un récipient contenant un plasmide contrôle porteur d'un vecteur rétroviral, contenant au moins un gène rapporteur.

15

25. Trousse selon la revendication 24, caractérisée en ce que les virus ou plasmides en (a), (b), (c) et (d) sont sous forme congelée.

26. Trousse selon la revendication 24 ou 25, caractérisée
20 en ce que en (a), gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.

27. Trousse selon l'une des revendications 24 à 26, caractérisée en ce que en (b), env est issu du GaLV et est sous le contrôle
25 du promoteur EF1.

28. Trousse selon l'une des revendications 24 à 27, caractérisée en ce que en (c), LTR et la séquence psi issues de rétrovirus
30 murins.

29. Trousse selon l'une des revendications 24 à 28, caractérisée en ce que en (c), le plasmide portant le vecteur rétroviral contient en outre un marqueur de sélection.

5 30. Trousse selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le virus en a) ou en b) est un adénovirus.

31. Trousse selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le virus en a) ou en b) est un baculovirus.

10

32. Trousse pour l'établissement d'une lignée productrice de particules rétrovirales à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant au moins :

(a) un récipient contenant un virus non rétroviral ou un
15 plasmide porteur d'un gène gag-pol,

(b) un ou plusieurs récipients contenant un virus non rétroviral ou un plasmide porteur d'un gène env,

(c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou un rétrovirus déficient ou un virus non
20 rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsulation, les séquences régulatrices, et un gène reporteur.

33. Trousse selon la revendication 32, caractérisée en ce que le virus est un adénovirus ou un baculovirus.

25

34. Trousse selon la revendication 32, caractérisée en ce que les virus ou plasmides en (a), (b), (c) sont sous forme congelée.

35. Trousse selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisée en ce que en (a), gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.

5 36. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (b), env est issu du GaLV et est sous le contrôle du promoteur EF1.

10 37. Trousse selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisée en ce que en (a), gag-pol est issu d'un lentivirus.

15 38. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (b), env est issu de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

20 39. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (c), le plasmide portant le vecteur rétroviral contient en outre un marqueur de sélection.

1/5

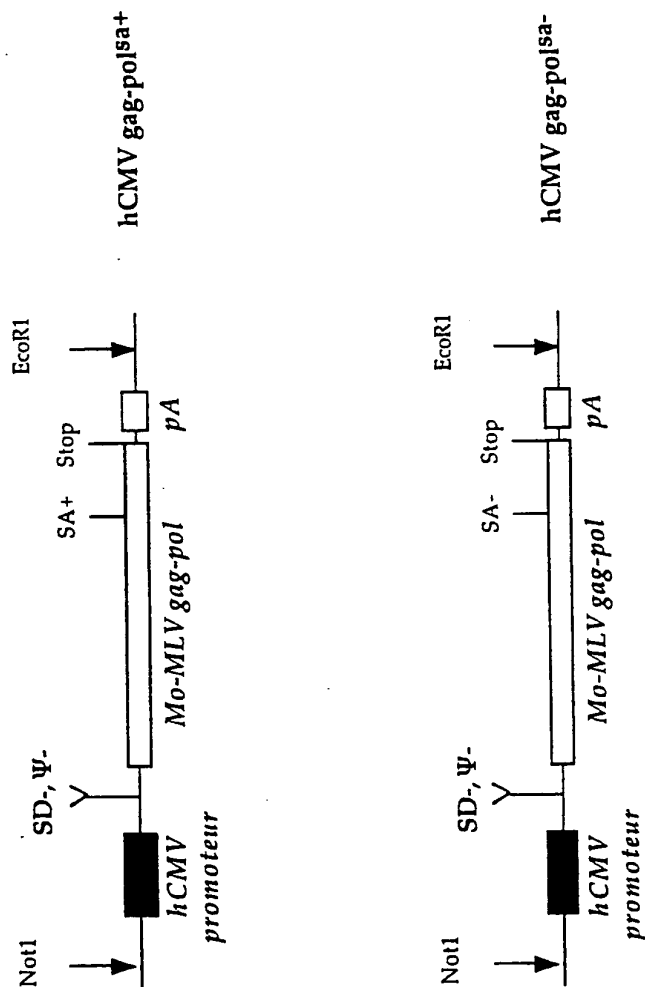


FIGURE 1

2/5

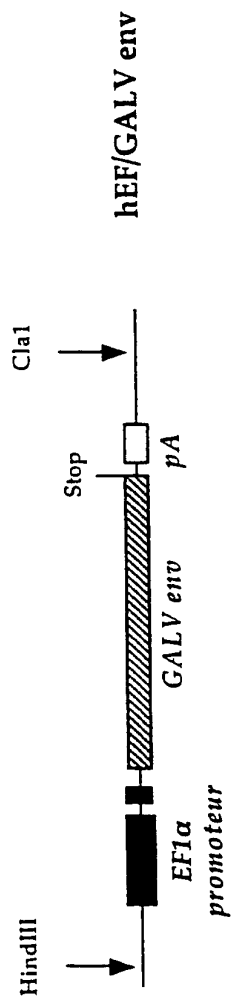


FIGURE 2

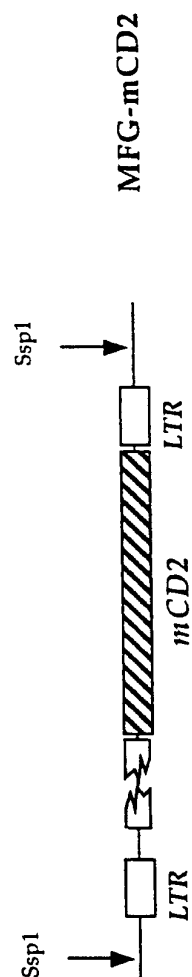


FIGURE 3

3/5

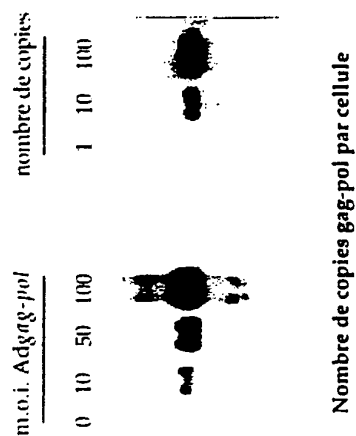


FIGURE 4

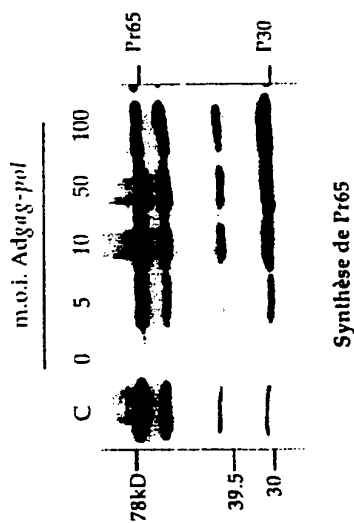
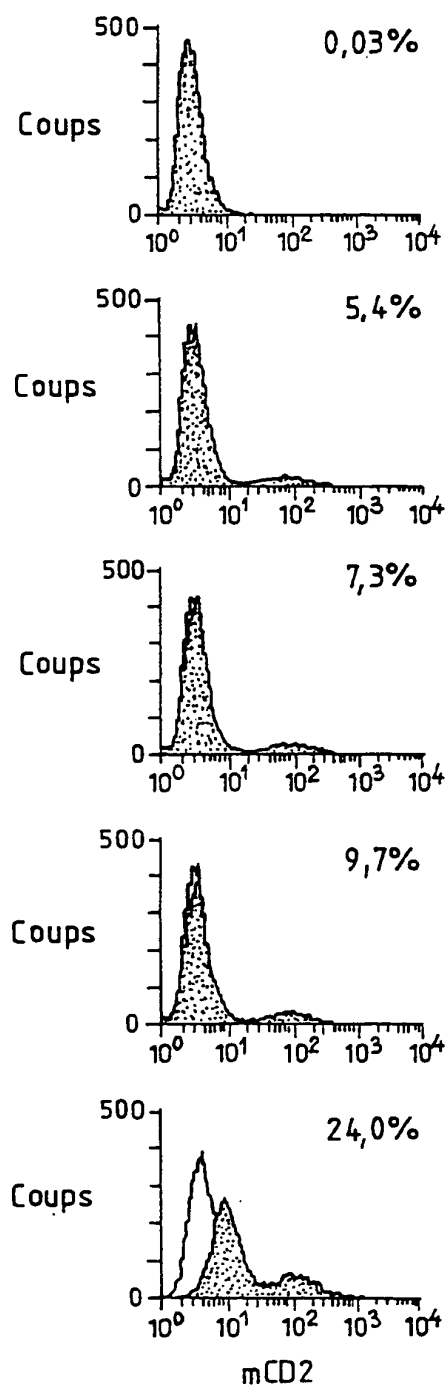
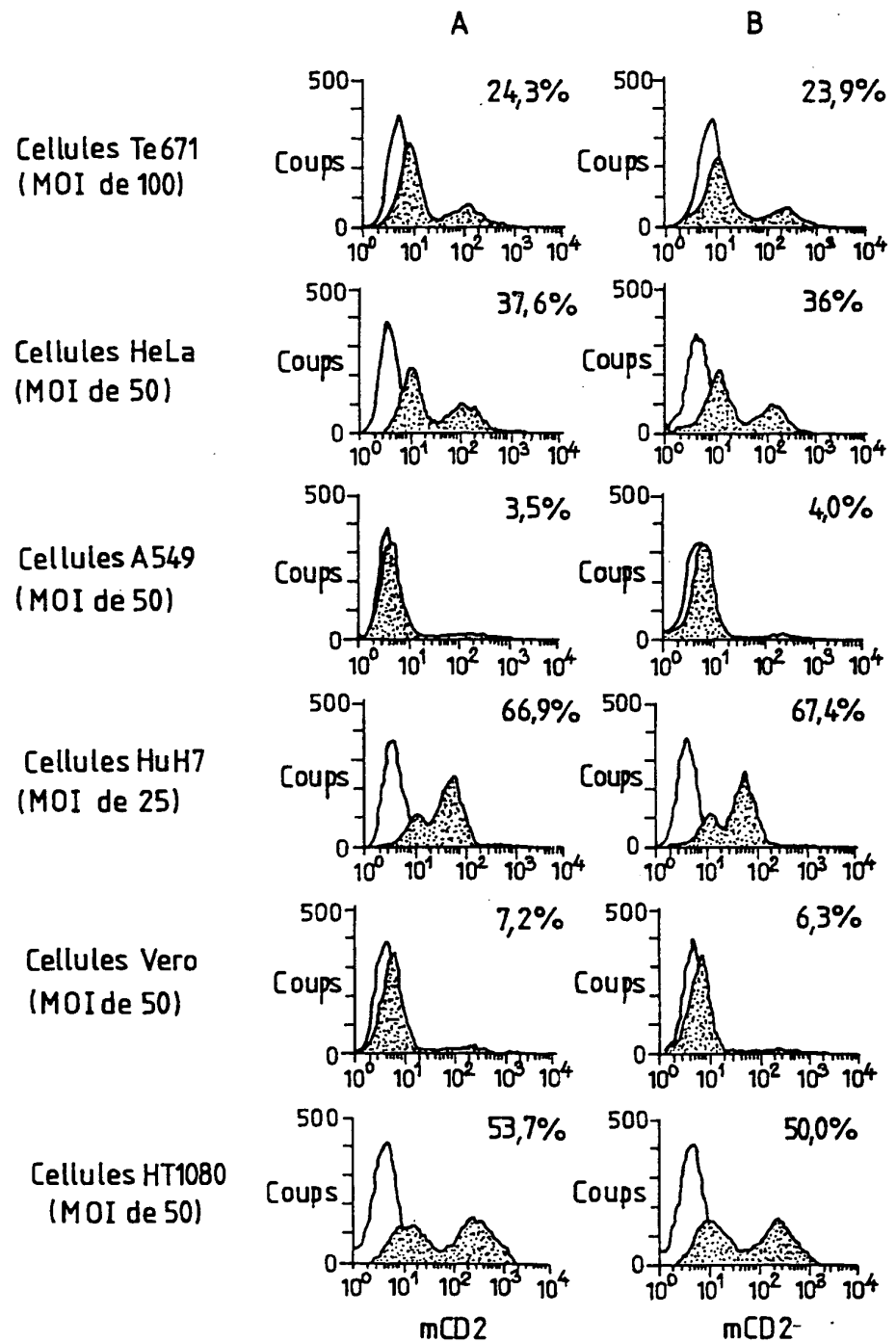


FIGURE 5

4/5

FIG_6

5/5

FIG_7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/FR 99/01353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N5/10 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATIENCE C ET AL: "Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 APR) 72 (4) 2671-6, XP002097709 the whole document	1-39
A	KIM S H ET AL: "Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 FEB) 72 (2) 994-1004, XP002097710 the whole document	1-39

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

30/11/1999

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Moreau, J

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No
 PCT/FR 99/01353

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAVARD N ET AL: "Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 MAY) 71 (5) 4111-7, XP002097711 the whole document	1-39
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." HUMAN GENE THERAPY, (1998 MAR 20) 9 (5) 695-706, XP002097712 the whole document	1-39
A	WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document	1-39
A	DAVIS J L ET AL: "Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies." HUMAN GENE THERAPY, (1997 AUG 10) 8 (12) 1459-67, XP002097713 cited in the application the whole document	1-39
A	ROLLINS S A ET AL: "Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response." HUMAN GENE THERAPY, (1996 MAR 20) 7 (5) 619-26, XP002097714 cited in the application the whole document	1-39
P,X	DUISIT G ET AL: "Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines." HUMAN GENE THERAPY, (1999 JAN 20) 10 (2) 189-200. , XP002122505 the whole document	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 99/01353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A EP 0817860 A JP 11502706 T	16-10-1996 14-01-1998 09-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date internationale No
PCT/FR 99/01353

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N5/10 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATIENCE C ET AL: "Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 APR) 72 (4) 2671-6, XP002097709 le document en entier	1-39
A	KIM S H ET AL: "Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 FEB) 72 (2) 994-1004, XP002097710 le document en entier	1-39
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "S" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SAVARD N ET AL: "Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 MAY) 71 (5) 4111-7, XP002097711 le document en entier	1-39
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." HUMAN GENE THERAPY, (1998 MAR 20) 9 (5) 695-706, XP002097712 le document en entier	1-39
A	WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE) 3 octobre 1996 (1996-10-03) le document en entier	1-39
A	DAVIS J L ET AL: "Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies." HUMAN GENE THERAPY, (1997 AUG 10) 8 (12) 1459-67, XP002097713 cité dans la demande le document en entier	1-39
A	ROLLINS S A ET AL: "Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response." HUMAN GENE THERAPY, (1996 MAR 20) 7 (5) 619-26, XP002097714 cité dans la demande le document en entier	1-39
P,X	DUISIT G ET AL: "Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines." HUMAN GENE THERAPY, (1999 JAN 20) 10 (2) 189-200, XP002122505 le document en entier	1-39

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Office International No

PCT/FR 99/01353

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A	16-10-1996
		EP 0817860 A	14-01-1998
		JP 11502706 T	09-03-1999